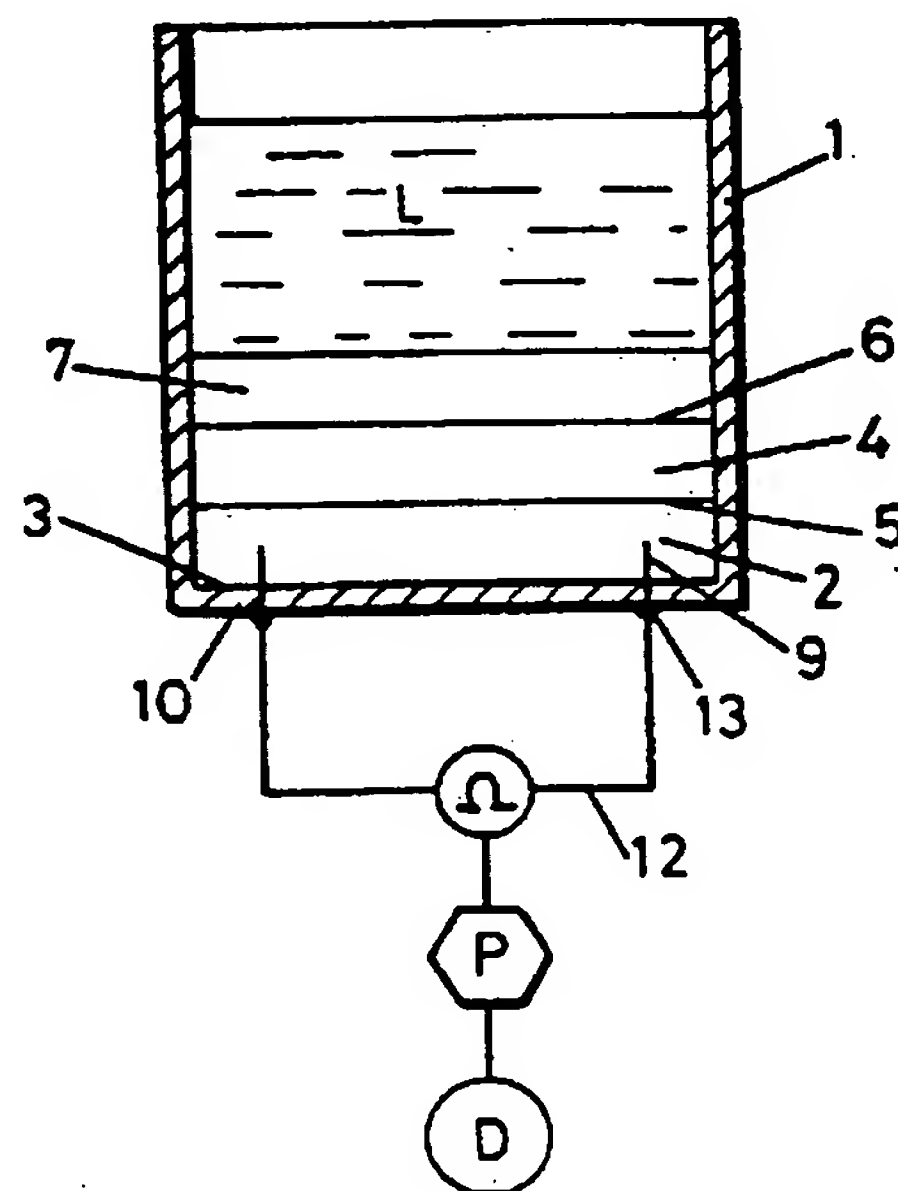


PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION  
International Bureau

## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

<b>(51) International Patent Classification<sup>4</sup> :</b>  <b>C12M 1/40, G01N 33/48</b>	<b>A1</b>	<b>(11) International Publication Number:</b> <b>WO 87/ 05624</b>  <b>(43) International Publication Date:</b> 24 September 1987 (24.09.87)
<b>(21) International Application Number:</b> PCT/GB87/00192 <b>(22) International Filing Date:</b> 19 March 1987 (19.03.87)  <b>(31) Priority Application Number:</b> 8606824 <b>(32) Priority Date:</b> 19 March 1986 (19.03.86) <b>(33) Priority Country:</b> GB  <b>(71) Applicant (for all designated States except US):</b> UNIVERSITY OF STRATHCLYDE [GB/GB]; McCance Building, 16 Richmond Street, Glasgow G1 1XQ (GB).  <b>(72) Inventors; and</b> <b>(75) Inventors/Applicants (for US only) :</b> SUCKLING, Colin, James [GB/GB]; 62 North Grange Road, Bearsden, Glasgow G61 3AF (GB). PETHRICK, Richard, Arthur [GB/GB]; 40 Langside Drive, Glasgow G43 2QQ (GB).		<b>(74) Agents:</b> McCALLUM, William, Potter et al.; Cruikshank and Fairweather, 19 Royal Exchange Square, Glasgow G1 3AE (GB).  <b>(81) Designated States:</b> AT (European patent), AU, BE (European patent), CH (European patent), DE (European patent), DK, FI, FR (European patent), GB (European patent), IT (European patent), JP, KR, LU (European patent), NL (European patent), NO, SE (European patent), US.  <b>Published</b> <i>With international search report.  Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of the receipt of amendments.</i>
<b>(54) Title:</b> BIOCHEMICAL DETECTOR  <b>(57) Abstract</b>  A device for use in the detection, in a liquid sample, of a predetermined analyte which is reactive under predetermined enzyme catalysed conditions so as to produce at least one of a proton and hydrogen peroxide. The device comprises an electrically conducting polymer element (2) having spaced apart connections (9) to an electrical circuit means (12) for directly or indirectly detecting changes in electrical resistance in the element (2). The polymer (2) contains conjugatable monomer units and is permeable to protons and where said analyte under said enzyme catalyzed conditions produces hydrogen peroxide, to hydrogen peroxide. The polymer (2) further has an electrical conductivity which is variable according to the amount of protons or hydrogen peroxide in contact therewith, and an enzyme support element (4) containing at least one enzyme and any cofactor(s) required in the predetermined enzyme-catalysed conditions, in an analyte permeable substantially non-conducting medium and also has a first face (5) in contact with the polymer element (2) and a second face (6) disposable in contact with the liquid sample. The present invention also provides a method of detecting a predetermined analyte in a liquid sample comprising the steps of contacting the liquid sample with the second face (6) of the enzyme support element (4) of the device and measuring the change in resistance between the connection means (9).		



## ⑫ 公表特許公報(A)

昭64-500054

⑬ 公表 昭和64年(1989)1月12日

⑭ Int. Cl. <sup>4</sup>	識別記号	庁内整理番号	審査請求 未請求	予備審査請求 未請求	部門(区分) 6(1)
G 01 N 27/06		A-6843-2G			
// C 12 M 1/40		B-8717-4B			
G 01 N 27/02		D-6843-2G			
27/30		J-7363-2G			

(全 6 頁)

⑮ 発明の名称 生化学的検出器

⑯ 特 願 昭62-501937

⑰ 出 願 昭62(1987)3月19日

⑱ 翻訳文提出日 昭62(1987)11月19日

⑲ 国際出願 PCT/CB87/00192

⑳ 国際公開番号 WO87/05624

㉑ 国際公開日 昭62(1987)9月24日

優先権主張 ㉒ 1986年3月19日 ㉓ イギリス(GB) ㉔ 8606824

⑳ 発明者 サックリング コリン ジェイ イギリス国 スコットランド グラスゴウ ジー61 3 エイエフ  
ムス ベアスデン ノース グレンジ ロード62

㉑ 発明者 ベスリック リチャード アー イギリス国 スコットランド グラスゴウ ジー43 2 キューキュー  
サー ラングサイド ドライブ40

㉒ 出 願 人 ユニバーシティ オブ ストラ イギリス国 スコットランド グラスゴウ ジー1 1 エックススキ  
スクライド ユー リッチモンド ストリート16 マツキヤンス ビルディング

㉓ 代 理 人 弁理士 芦田 直衛 外1名

㉔ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CH(広域特許), DE(広域特許), DK, FI, FR(広域特許), GB  
(広域特許), IT(広域特許), JP, KR, LU(広域特許), NL(広域特許), NO, SE(広域特許), US

## 請 求 の 範 囲

1. 共役可能なモノマーユニットを含有し、プロトン透過性で、被検体が酵素反応条件下で過酸化水素を生成する場合は過酸化水素透過性であり、プロトン又は過酸化水素の量に応じて導電率が変化する導電性ポリマー素子(2)を、そのポリマー素子に間隔をおいて設けられた接合手段(9)にて、ポリマー素子内での電気抵抗の変化を直接的又は間接的に検出するための電気回路(12)と接続し、少なくとも一つの酵素と予め決められた酵素反応条件下で必要ないずれかの補助要因を含有し、被検体透過性で非導電性の酵素支持素子(4)をその第1の表面(5)で、前記の導電性ポリマー素子(2)と接触させ、第2の表面(6)に前記の液体サンプルと直接的又は間接的に接触せしめて構成され、プロトンと過酸化水素の少なくとも一つを放出する予め決められた酵素反応条件下で反応性を有する被検体を、液体サンプル中で検出するのに使用する装置。
2. 前記装置に使用する液体サンプル中の少なくとも1種の他の成分をスクリーニングするために被検体を選択的に透過するフィルター部材(7)を、前記第2の表面(6)に設けた請求の範囲1記載の装置。
3. 前記のフィルター部材が蛋白質物質及び巨大分子物質の少なくとも一つを実質的に透過しない請求の範囲2記載の装置。
4. 前記のフィルター部材が高度に架橋した湿潤性の重合体ゲルからなる請求の範囲2又は3記載の装置。
5. 被検体と接触した際にプロトンを生成する酵素反応系(4)が使用され、装置の感度を増大するためにポリマー素子(2)が還元された形で使用される請求の範囲1~4のいずれかに記載された装置。
6. 薄膜状ポリマー素子(2)の少なくとも一方の側面を酵素支持素子(4)で被覆した薄膜多層構造にある請求の範囲1~5のいずれかに記載した装置。
7. 接合手段(9)が高導電性金属電極の形にあり、それがポリマー素子(2)内に延びている請求の範囲1~6のいずれかに記載した装置。
8. ポリマー素子(2)が $10^{-4} \sim 10^2 \text{ Scm}^{-1}$ の導電率を有するポリマーからなる請求の範囲1~7のいずれかに記載した装置。
9. 酵素支持素子(4)がプロトンを放って被検体の酸化を触媒する特定の被検体脱酸素酵素を含有する請求の範囲1~8のいずれかに記載した装置。
10. 酵素支持素子(4)が過酸化水素を放って被検体の酸化を触媒する特定の被検体酸化酵素を含有する請求の範囲1~8のいずれかに記載した装置。
12. 前記のポリマー素子(2)、酵素支持素子(4)及びフィルター部材(7)が試験溶液(L)を収容する容器(1)内に組込まれ、試験溶液が酵素支持素子(4)の第2表面(6)と直接的に又はフィル

## 明 細 書

## 生化学的検出器

本発明は液体サンプル中の生化学的被検体の測定に使用される装置に関する。

体液中の様々な生化学的被検体濃度を規則的に監視することは、ある種の病気の治療に極めて重要であって、例えば糖尿病の場合には、液中のグルコース濃度を測定するために、幾つかの方法が既に提案されている。そうした方法の一つでは、グルコースの酵素反応が、その反応に起因する蛍光スペクトルの変化で監視される。他の方法では、酵素電極がグルコース酸化酵素で被覆され、その被覆層内での酵素とグルコースとの酵素反応による酵素量の減少が電極で測定される。しかし、いずれの場合とも比較的検作が面倒で高価な特殊な装置を使用するため、制限された状況の下でしかグルコースの定量を行うことができない。

本発明の目的の一つは、上記した不都合の幾つかを解消又は軽減することにある。

本発明は、プロトンと過酸化水素の少なくとも一つを放出する予め決められた酵素反応条件下で反応性を有する被検体を、液体サンプル中で検出するのに使用する装置を提供するものであって、その装置は共役可能なモノマーユニットを含有し、プロトン透過性で、被検体が酵素反応条件下で過酸化水素を生成する場合は過酸化水素透過性であり、プロトン又は過酸化水素

ター部材(7)を介して間接的に接触する請求の範囲1~10のいずれかに記載した装置。

12. 前記被検体とその抗体との反応で不活性を活性に変換される少なくとも一つの抗体結合酵素を、前記の酵素支持素子(4)が含有し、さらに酵素支持素子(4)が活性状態の前記酵素の存在下にプロトン及び過酸化水素の少なくとも一つを生成する試薬を含有する請求の範囲1~11のいずれかに記載した装置。
13. 前記の接合手段に接続された前記の電気回路を備えた請求の範囲1~12のいずれかに記載した装置。
14. 請求の範囲1に示すような装置(1)の酵素支持素子(4)の第2表面(6)に、液体サンプル(1)を直接的に又は被検体を選択的に透過するフィルター部材(7)を介して間接的に接触させる工程と、装置(1)のポリマー素子(2)の接合手段(9)の間の抵抗変化を測定する工程を含む液体サンプル中の予め決められた被検体を検出する方法。

の量に応じて導電率が変化する導電性ポリマー素子を、そのポリマー素子に間隔をおいて設けられた接合手段にて、ポリマー素子内での電気抵抗の変化を直接的又は間接的に検出するための電気回路と接続し、少なくとも一つの酵素と予め決められた酵素反応条件下で必要ないずれかの補助要因を含有し、被検体透過性で非導電性の酵素支持素子の第1の表面を、前記の導電性ポリマー素子と接触させ、第2の表面を前記の液体サンプルと直接的又は間接的に接触せしめて構成される。

この装置は好ましくは、被検体を選択的に透過するフィルター部材を備え、そのフィルター部材は、装置に用いられる液体サンプル中の少なくとも一つの異種成分を、好ましくはすべての異種成分をスクリーニングするために、酵素支持素子の第2表面上に設けられる。

本発明の装置でプロトンの生成及び検出を行う場合には、装置の感度を増大させるために、前記のポリマー素子を未知の被検体含有液に浸漬する前に、望ましくは還元する。還元は適当な手段で行うことができるが、好適には稀薄水酸化ナトリウムのようなアルカリ性水溶液に浸漬することで行なわれる。

本発明の装置によれば、被検体の存在量が導電率の変化として観測されるが、その導電率はオームメーター又は抵抗ブリッジ回路のような入手が容易及び/又は比較的安価な各種の装置に、ポリマー素子を前記の

接合手段で接続することにより測定することができる。ここで注目すべきは、従前の検出システムと相違して、本発明の装置は嫌気性条件のような特別な外的操作条件を、一般に必要としないことである。

本発明の装置は様々な形状及び寸法に相立てることができるが、一般には片側又は両側が酵素支持素子で被覆された両面ポリマー素子で作られる多層薄膜装置の形にある。片側だけが酵素支持素子で被覆されている場合、他方の側はポリマー素子に無用の作用が及ばぬよう不透過性被覆でシールされる。フィルター部材を設ける場合、このものは一般に酵素支持素子の被覆の上を被覆する形にある。

本発明の接合手段は、通常高伝導率の金属電極、例えば白金、銀、金又は銅のような金属電極の形にあって、ポリマー素子内にのびている。これらの電極はポリマー素子の支持体として使用することが好適であり、この場合、ポリマー素子は電極の一部を覆うフィルム状コーティングになる。

共役モノマーユニットを含有する様々な導電性ポリマーが、本発明のポリマー素子に使用可能である。適当なポリマーは一般に $10^{-4} \sim 10^2 \text{ Scm}^{-1}$ の範囲の導電率を有している。そのようなポリマーにはポリピロール及びアニリンとピリジン又は他の四級化可能な共役モノマーユニットを基本とするポリマーが含まれる。プロトンを生成する酵素系を使用する装置の場合



## 特表昭64-500054(3)

合、ポリマーは上記の具体例で示したような四級化可能な窒素原子を有し、プロトンを取付可能なモノマーユニットを含んでいなければならない。

本発明のポリマーは周知の方法により所望の導電率を持った適当な形状に製造することができる。一般に、そのポリマーは電気化学的に安定で液中にイオン種を保持でき、従って溶液の導電率を維持することができる極性溶媒に、適当量の導電率付与ドーパントとモノマーを溶かし、その溶液を電気化学的セル中に入れて電気化学的に重合することによって製造することができる。様々な適当なドーパントは当業界でよく知られており、これらには例えばスルホン酸、過塩素酸及びフッ化ホウ素酸のような強プロトン酸が包含される。これらドーパントはその性状並びに導電率、安定性及び／又は扱い易さとの関係で、ポリマーにいろいろな比率で使用することができる。通常はポリマーの繰返し単位に対し、4～2のモル比で、好ましくは4～3のモル比でドーパントが使用される。

一般に、二つの電極を有する電気化学的セルが使用され、電極には通常白金、金、銀のような高伝導性金属が使用される。電極間に付与される電圧は、ポリマーの酸化還元ポテンシャルの±0.5Vの範囲である。実際には、電極にポリマーが所望の範囲で形成されるよう、セル内には例えば標準カロメル電極(SCE)のような参照電極が、電極の電圧を監視、調節するた

めに挿入される。SCE参照電極が使用される場合、ポリマーが形成される電極はSCEに対し一般に0.5V～1.5Vの電圧に維持される。

付与電圧、温度、溶媒、モノマー及びドーパント濃度、重合速度、電極構造のような電気化学的重合条件は、一般には薄膜状である適当な形状のポリマーを製造する上で、大規模に又は小規模に健康できることは評価に値する。適当なポリマー、特にポリピロールの薄膜は、例えば合衆国マサチューセッツ州ケンブリッジのボラロイド・コーポレーションから商業的に入手可能である。アセトニトリル及びジメチルホルムアミドのような有機溶媒に可溶なポリマーの場合、ポリマーは当初別の形に、例えば顆粒状に製造することができ、次いでこれを適当な溶媒に溶かして溶液とし、その溶液を適当な基板に、例えば導線トラックが形成され、ポリマーから適当な抵抗測定装置への電気的接合部を備えたプリント回路基板等に塗布することができる。この場合、望むとあらば、プリント回路基板等に抵抗測定装置を組み込むことも可能である。

電気化学的重合条件もポリマーの導電率を調節するために変化させることができる。一般に、ポリマーは測定すべき被検体の濃度及び装置に使用する抵抗測定装置の感度等のような因子にも依存するが、 $10^{-4} \sim 10^2 \text{ Scm}^{-1}$ の範囲の導電率を有していることが望ましい。導電性ポリマーを製造する適当な方法の詳細は、

例えばエフ・エム・アルーアレイド(F.H. Al-Arrayed)ほかのMaterial Forum 1986, 9, 209-216に記載されている。

本発明の装置が被検体含有溶液と接触した際のポリマーの導電率を監視するのには、抵抗／導電率を直接的又は間接的に測定する様々な装置が使用できる。例えば、装置の抵抗を測定し、その抵抗を絶対値に変換する標準オームメーターや抵抗ブリッジ回路が使用可能である。一般に、生じた導電率の変化に対応して被検体の濃度を、ディスプレイ又は他のアウトプットデータに直接指示できる測定装置を使用することが有利である。ある種のポリマーフィルムは調製が時間に依存することは留意すべきである。また、ポリマー素子全体が平衡状態に到達する間本発明の装置の応答速度は、とりわけ、ポリマー素子の構造や酵素支持素子と接触するポリマー素子の容積に対する表面積によってかなり変化する。従って、装置を使用するに際しては、一方では被検体含有溶液を装置に導入する前の初期伝導率を測定すると共に、被検体含有溶液と接触後適当な時間に導電率の相対的变化を求めることが必要であり、他方では初期露出後の導電率の経時変化を監視する必要がある。このような場合には、既知の被検体溶液を基準として予め確立された相関関係に従って、導電率の変化を被検体濃度に相関させるような適当なデータ記録装置又はデータ処理装置と共に、

本発明の装置を使用するのが便利である。

被検体そのものの酵素反応又は被検体と酵素反応によってえられる誘導体との酵素反応で、プロトン又は過酸化水素を生成する酵素反応系は当業界でいろいろ知られている。アルコール被検体を測定する適当な酵素反応系では、NADの助けを借りてアルコールを、例えばエタノールをアセトアルデヒドに酸化する反応を触媒し、プロトンを放出するアルコール脱水素酵素が使用される。乳酸の測定に適した反応系では、NADの助けを借りて乳酸をピルビン酸に酸化する反応を触媒する乳酸脱水素酵素が使用される。またグルタミン酸の測定には、NADの助けを借りてグルタミン酸を2-オキシグルタミン酸に酸化する反応を触媒するグルタミン酸脱水素酵素が使用される。グルコースの測定に適した酵素系は、グルコースをグルコン酸に酸化し、過酸化水素を放出する反応を触媒するグルコース酸化酵素である。このタイプの他の反応系は、酵素コレステロール酸化酵素を使用してコレステロールを測定するのにも使用可能であって、この場合にも過酸化水素を放出する。ある種のアミン及びアミノ酸は、同様にして適当なアミン又はアミノ酸酸化酵素を使用して検出することができる。さらにまた、他の被検体はその抗体に結合する酵素を使用して検出可能であり、被検体と抗体との結合は、酵素を触媒的に不活性な形から触媒的に活性な形に変化させるので、このものは

## 特表昭64-500054(4)

適当な反応物によりプロトン又は過酸化水素を放出する反応を触媒する。従って、例えばメトトレキサート等の細胞毒性の薬物、ビーナッツ、トウモロコシ、小麦等に生えるカビによって生成されるアフラトキシン等の食品毒、ジオキサン等の工業的流出物及び毒性生成物のような被検体も、本発明の装置を使用して測定することができる。好適には、適当な試薬によってプロトン又は過酸化水素の放出を触媒する酵素を、適当な蛋白質反応によって、例えばカルボキシル基とアミノ基の結合をもたらすカルボジイミドを使用して、あるいはナトリウムシアノボロハイドライドとアミンを用いてアルデヒドの還元アミノ化を使用して、あるいはまた、無水物でアミノ基をアシル化する反応や他の当業界で知られた適当な手法を使用して、被検体サンプルに共役させた系を利用することもできる。使用準備ができた装置では、被検体-酵素の共役は酵素に対する抗体で結合されている。従って、装置が被検体分子含有溶液と接触すると、これらは以前結合していた酵素-被検体共役に置き換って抗体と結合し、プロトン又は過酸化水素放出試薬の触媒反応に酵素-被検体共役を自由にする。一例を挙げれば、グルコース酸化酵素を、グルコースからグルコン酸への酸化を触媒するグルコース酸化酵素で過酸化水素を放出するグルコース試薬と共に使用することができる。

既に記した通り、液体サンプル中に存在する異種物

質から酵素支持素子及びポリマー素子を保護するために、酵素支持素子はフィルター部材で好ましくは被覆される。液体サンプルが生化学的液体である場合、例えば様々な異種物質を含有する血液又は尿を液体サンプルとする場合は、フィルター部材を使用することが特に望ましい。一般にフィルター部材は蛋白質系物質及び/又は巨大分子物質を実質的に透過しない。適当なフィルター部材はポリアクリルアミド及び多糖類のゲルのような高度に架橋された網目性重合体ゲルを包含する。

フィルター部材は導電性ポリマーフィルムの外表面上に層を形成して確保されていることが好ましく、フィルター部材が重合性ゲルである場合には、これを導電性ポリマーフィルム上で重合させてその上にフィルター層を形成することができ、また外的な機械的支持部材にてフィルター層を導電性ポリマーフィルム上に確保することもできる。従って、本発明の装置は、例えばポリ塩化ビニル等のプラスチック物質のように、不活性で非透過性で電気絶縁性のハウジング内に、フィルター部材の外表面の中央領域に窓を設けて嵌込むのが便利である。本発明の装置では、被検体が含まれていると思われる未知の溶液が、酵素支持素子の第2の表面に直接、又は前記のフィルター部材を介して接触し、電気的接合部間の導電率の変化が、抵抗測定装置で測定される。

従って、別の観点から見れば本発明は液体サンプル中の予め決められた被検体を検出する方法を提供するものであって、その方法は本発明の装置の酵素支持素子の第2の表面に、液体サンプルを直接接触させるか又は被検体を選択的に透過するフィルター部材を介して接触させる工程と、前記装置のポリマー素子の接合部間の抵抗の変化を測定する工程を包含する。

本発明のさらに好ましい特徴と利益は、添付図面を参照して好ましい具体例を説明する以下の記述から明らかになる。第1図は液体サンプル中のエタノール含量を測定するのに使用する本発明の装置の縦断面図である。第1図はガラスのような不活性で絶縁性の容器1の底部3に導電性のポリピロール層2を持った本発明の装置を示している。エタノール透過性で実質的に非導電性の酵素支持層4は、前記のポリピロール層2の上に位置し、これと第1の表面5で接触し、第2の表面6はフィルター部材層7でカバーされている。白金線9の形をとる二つの間隔をおいた電気的接合部は、容器1の底壁10を通過してポリピロール層2まで延び、その端部13は導線12でオームメーターΩに接続される。

酵素支持層4はポリアクリルアミド又は多糖類のゲルのような高度に架橋した網目性重合体ゲルからなり、これには酵素が必要な補助因子と共に固定される。ここに説明する装置の場合、まず1000~2000の範囲の

分子量を有するポリアクリルアミドのプレポリマーが調製され、これにエタノール脱水素酵素と補酵素NADが添加される。次いでこのプレポリマーは酵素と補酵素を固定するため、通常の方法で架橋せしめらる。

オームメーターΩから得られた抵抗測定値を変換するために、データ処理ユニットPがオームメーターΩに接続される。このユニットは連続的に測定される抵抗値の相違を記録し、かつこれを既知の溶液で予め確立されている相関関係に応じて処理し、エタノール濃度に相当する出力信号を提供するものであって、これは次いで適当なディスプレイ装置Dで表示される。

## 実施例1-エタノールセンサーの調製

ポリピロールフィルム(2.5×1.1cm、厚さ0.2mm)を、二つの金属導体の脚が間隔をおいてフィルムに固定されるよう、適当な非伝導性の樹脂接着剤、例えばスイスのバゼルにあるチバーガイギー社から「アラダイト」の商品名で入手できる接着剤を使用して、ガラススライドの支持体に装着した。この樹脂はスライドとフィルム間での脚を絶縁コーティングするのにも使用される。オームメーターに接続するための適当な導電性リード線が、スライド上の金属導体脚に接続されている。次いでこのフィルム素子を容器内に収め、これに活性なポリアクリルアミドプレポリマー(PAN)1.5gを添加した。1.5gのPANは約1000μモルの活性エステルを含有するが、このものはホワイト

サイドの方法 (A. Pollak等、J. Chem. Soc., 1980, 102巻、6324頁) に従い、pH7.5 のヘベス (Hepes) バッファー 0.3 M、塩化マグネシウム 30 mM 及び NAD 0.3 mM (8 ml) からなる緩衝液に、2~3分間で静かすことで調製した。ジチオトレイトール (0.1 ml) を加えた後、トリエチレンテトラミン (0.85 ml) を加えて架橋反応を開始させた。2.5分後、上記の緩衝液 (1 ml) にウマ肝臓から得たアルコール脱水素酵素 (40 mg) を溶かした溶液を添加した。2分後ポリマーはゲル化し始め、酵素含有ポリアクリルアミドゲルで被覆されたポリビロールフィルムを取出した。この被覆フィルム次いで室温で1時間空気中で乾燥し、硝酸アンモニウム (50 mM) を含有する上記の緩衝液溶液に漬けて20分間洗浄し、最後に緩衝液だけで洗浄した。洗浄された被覆ポリマーを一夜乾燥してセンサーを用意した。

#### 実施例2—グルコースセンサーの調製

ポリビロールフィルムの別のサンプルを使用し、ウマ肝臓から得たアルコール脱水素酵素に代えてグルコース酸化酵素を使用し、さらに緩衝液からニコチンアミドヌクレオチド (NAD) を除いた以外は上記のエタノールセンサー調製について述べた手順を繰返してグルコースセンサーを調製した。

#### 実施例3—エタノールの検出

実施例1のエタノールセンサーを5分間水酸化ナトリウム水溶液 (1M) に漬けてまず脱プロトンした (浸漬

時間を延長して30分間程度とする場合は、例えば 0.5 M 程度の低い濃度とすることもできる)。

次いでエタノールセンサーを脱イオン水に漬けて平衡させて水から取出し、表面上の水を振り落とす。次にセンサーの導電率を、ソラルトロン シュルンベルガー 1186 電気化学的インターフェース (英国ハンブシャー、ファーンバラのソラルトロンリミテッド製) で測定した。エタノール (100  $\mu$ l) を脱イオン水に加えてエタノール濃度を 10 mM とし、この溶液にセンサーを浸漬した。2分間浸漬して導電率を測定する操作を繰返した。

#### 結 果

10分後、電流は 0.9  $\mu$ A だけ上昇し、30分後に 2.0  $\mu$ A の最高値に到達した。さらにエタノールサンプル (100  $\mu$ l) を加えて溶液の濃度を 20 mM として実験を繰返した。10分後、電流は 0.9  $\mu$ A に増大し、30分後に 2.8  $\mu$ A となった。さらにエタノールサンプル (100  $\mu$ l) を加えて溶液の濃度を 30 mM として実験を繰返した。電流は10分後 1.2  $\mu$ A に増大し、30分後に 2.8  $\mu$ A となった。

最初の脱プロトン工程は事実上任意的ではあるが、センサーの応答性並び感度を増大する上で利益がある。センサーのポリビロールフィルムには、実質的に脱プロトンされたフィルムを最初から使用することができ、そうしたフィルムは過電圧で、好ましくは SCE に対して 4.5~3.0 V で電気化学的に重合することで調製

できる。

#### 実施例4—グルコースの検出

グルコースセンサーを脱イオン水に漬けて平衡させ、表面の水を切って実施例3と同様に導電率を測定した。グルコース (100 mg) を加えて濃度 30 mM の溶液を調製し、これにセンサーを浸漬した。2分間浸漬して導電率を測定する操作を繰返した。

#### 結 果

4分後、電流の増加は 30  $\mu$ A であり、20分後に 40  $\mu$ A の最高値に到達した。

別々に調製した僅かに薄い2枚のフィルムを同じ条件下に使用して同様な操作を行うと、25 mM のグルコースを含有する溶液の電流増大は、20分後で 37  $\mu$ A 及び 40  $\mu$ A であった。

#### 実施例5—コレステロールセンサーの調製

アルコール脱水素酵素及びニコチナミドアデニンジヌクレオチドの代わりにコレステロール酸化酵素 (1 mg) 英国プール、シグマケミカルカンパニーリミテッド社を使用した以外は実施例1と同様な手順でセンサーを調製した。ゲル化時間は 2.5分であり、架橋時間は2分であった。

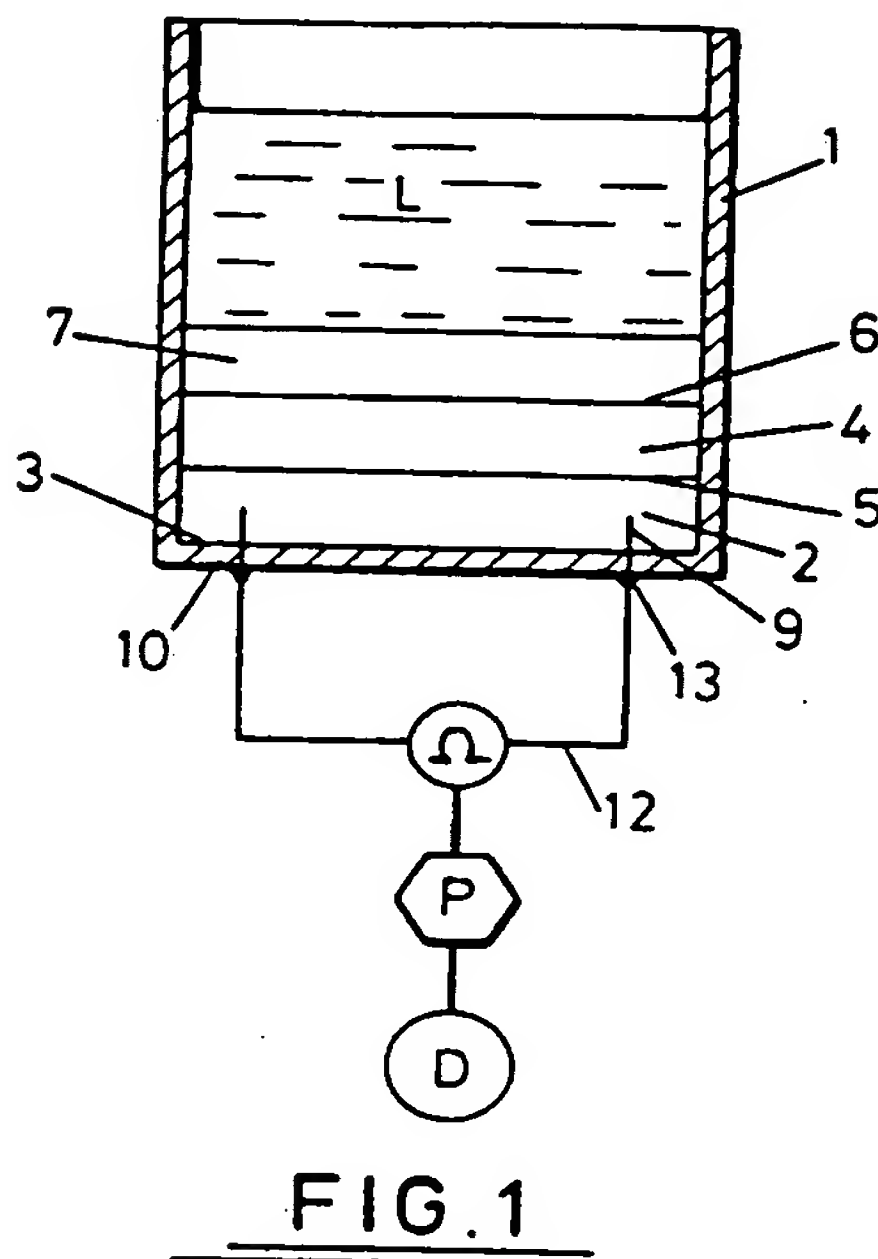
#### 実施例6—コレステロールの検出

エタノール検出の実施例3のように、コレステロールセンサーを平衡させた。コレステロール水含有 10% Brij 30 (英国の ICI から入手できる非イオン系ポ

リエチレンオキシド洗浄剤) 溶液に対するこのセンサーの応答を調べた。

#### 結 果

コレステロール (100  $\mu$ l) の溶液に浸漬すると、導電性は15分で 3  $\mu$ A に上昇し、70分で 6  $\mu$ A の最大に達した。



PCT/GB 87/2012	
A CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IN ORDER TO ESTABLISH A COMMON BASIS FOR THE CLASSIFICATION OF THE INVENTION	
According to International Patent Classification (IPC) or to both International Classification and IPC	
IPC <sup>4</sup> :	C 12 M 1/40; G 01 N 33/48
A FIELD SEARCHED	
Minimum Documentation Searched	
Classification System	
IPC <sup>4</sup> :	C 12 M; G 01 N
See information Searched other than Minimum Documentation in the Legend that such documents are included in the Fields Searched	
B. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <sup>5</sup>	
Category:	Claims or Drawings, with and without where appropriate, of the relevant documents
X	EP, A. 0096095 (M. PALMROS) 21 December 1983 see figures: claims
Y	1-9,11,13,14 1-14
Y	EP, A. 0121385 (CAMBRIDGE LIFE SCIENCES PLC) 10 October 1984 see claims; figures; examples; page 5, paragraph 1; page 7
A	FR, A. 2282114 (COMPTOIR SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE DE L'OUEST S.A. ETS. M. PORTE REUNIS) 12 March 1976 see claims 1,2,5
A	FR, A. 2047047 (MILES LABORATORIES INC.) 12 March 1971 see claims 1-4,7,8-11; page 6, line 21 - page 7, line 2
X	US, A. 4334880 (M.R. PALMROS) 15 June 1982 see claims and figures
1	1-9,11-14
/.	
<p>* Several categories of cited documents:</p> <p>"A" documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"Y" category documents that published on or after the international filing date</p> <p>"X" documents which may have claims or priority rights or which are cited in the international search report or in the international search report or in the international search report or in the international search report or in the international search report</p> <p>"A" documents published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"Y" documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the disclosure of the invention</p> <p>"X" documents of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to be obvious in view of the disclosure of the invention</p> <p>"A" documents of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to be obvious in view of the disclosure of the invention</p> <p>"Y" documents published prior to the international filing date or priority date and not in conflict with the disclosure of the invention</p> <p>"X" documents published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"A" documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the disclosure of the invention</p>	
C. CERTIFICATION	
Date of the Actual Comparison of the International Search	Date of Mailing of the International Search Report
1st July 1987	31 JUL 1987
International Searching Authority	Signature of a certified official
EUROPEAN PATENT OFFICE	M. VAN MOI

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)	
Category	Character of Document and reference, where appropriate, of the specific passages
A	FR. A. 2228839 (BACTOMATIC) 6 December 1974
A	FR. A. 1479929 (LABORATORY EQUIPMENT CCR2.) 5 May 1967

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON

INTERNATIONAL APPLICATION NO. PCT/GB 87/00192 (5A 16575)

This Annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EPO file on 16/07/87

The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0096095	21/12/83	None	
EP-A- 0121385	10/10/84	WO-A- 8403945 AU-A- 2730384	11/10/84 25/10/84
FR-A- 2282114	12/03/76	None	
FR-A- 2047047	12/03/71	NL-A- 7009119 DE-A- 2030713 GB-A- 1301535 BE-A- 752408	28/12/70 14/01/71 29/12/72 23/12/70
US-A- 4334880	15/06/82	US-A- 4444892	24/04/84
FR-A- 2228839	06/12/74	None	
FR-A- 1479929		US-A- 3421982 GB-A- 1073767	14/01/69

For more details about this annex :  
see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82